

## ЛИПИДНАЯ СТРАТЕГИЯ ПОВЫШЕНИЯ БИОДОСТУПНОСТИ НУКЛЕОЗИДНЫХ ИНГИБИТОРОВ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПТАЗЫ ВИЧ

Н.С. Шастина, доцент, Е.О. Баранова, аспирант, Л.Н. Дьякова,  
аспирант, Д.В. Лоншаков, студент, В.И. Швец, заведующий кафедрой  
кафедра Биотехнологии и бионанотехнологии МИТХТ им. М.В. Ломоносова  
e-mail: inosit@yandex.ru

**В** последние годы широко исследуются различные подходы к конструированию пролекарственных соединений на основе применяемых в терапевтической практике анти-ВИЧ-активных нуклеозидных препаратов. В работе рассмотрены принципы модификации лекарственных средств данного класса с помощью веществ липидной природы, позволяющие образующимся конъюгатам встраиваться в естественные пути транспорта и метаболизма природных липидов, что приводит к повышению биодоступности нуклеозидных агентов. Представлены литературные данные, посвященные исследованиям пронуклеотидного подхода для повышения терапевтической эффективности нуклеозидных препаратов и снижения их побочного действия на организм. Также приводятся результаты собственных экспериментальных исследований путей синтеза и свойств новых липидмодифицированных анти-ВИЧ-нуклеозидов.

*In recent years, various approaches to the prodrug design on the basis of anti-HIV active nucleoside compounds used in the therapy are intensively investigated. In this paper, the principles of modifying this class of drugs by lipid substances allowing obtained conjugates to insert in natural lipid transport and metabolic pathways that can increase nucleoside agents bioavailability are described. Literature data associated with the research of the pronucleotide approach serving the purpose of increasing nucleoside drugs therapeutical efficacy and reducing the side effects on the organism are reviewed. Experimental data obtained by the authors in course of research of synthetic routes and properties of the new lipid-modified anti-HIV nucleosides are also presented.*

**Ключевые слова:** анти-ВИЧ-нуклеозиды, пролекарственные соединения, псевдо триглицериды, инозитсодержащие фосфолипиды, биодоступность.

**Key words:** anti-HIV-nucleosides, prodrugs, pseudo triglycerides, inositol containing phospholipids, bioavailability.

Одной из актуальных проблем современной фармакологии является создание противовирусных препаратов, в частности, для лечения ВИЧ-инфекции. Нуклеозидные анти-ВИЧ-препараты составляют основу высокоактивной антиретровирусной терапии и препятствуют работе обратной транскриптазы вируса, конкурируя с природными субстратами и терминируя растущую цепь вирусной ДНК [1–3]. Однако применяемые в терапии вирусных заболеваний нуклеозидные препараты наряду с высокой эффективностью действия имеют существенные недостатки, связанные с их низкой биодоступностью, слабой способностью к трансмембранному транспорту, необходимостью использования высоких доз этих лекарственных соединений, что сказывается на проявлении ими токсических свойств, формировании резистентных вирусных штаммов.

Эти недостатки стимулируют поиск и изучение различных подходов к структурной модификации данных химиотерапевтических агентов. Одним из путей является создание конъюгатов анти-ВИЧ-нуклеозидов с веществами липидной природы: жирными кислотами, диглицеридами и фосфолипидами [4, 5]. Такие липофильные пролекарственные соединения сами по себе являются фармакологически неактивными, в организме же они подвергаются ферментативному гидролизу, приводящему к

высвобождению фармакологически активного соединения – противовирусного нуклеозида. Данный подход, во-первых, позволяет значительно улучшить биотранспортные характеристики лекарственных средств за счет придания им гидрофобных свойств (рис. 1). Во-вторых, дает возможность нацеливания анти-ВИЧ-нуклеозидов на лимфатическую систему (увеличение их лимфотропности), что обусловлено путями метаболизма соединений липидной природы в организме человека, при этом лимфатический транспорт позволяет избежать первичного метаболизма этих соединений в печени, таким образом повышая их биодоступность. Кроме того, он обеспечивает направленное воздействие модифицированных препаратов на вирусы, так как последние локализуются и распределяются в организме главным образом в лимфатической системе.

Применение пролекарственного подхода к нуклеозидным противовирусным препаратам может привести к преодолению недостатков лекарственных средств данного класса, а также придать им новые свойства.

Конструируя модифицированные нуклеозидные препараты, необходимо учитывать естественные пути метаболизма липидов внутри организма: гидролиз, абсорбцию, внутриклеточную трансформацию в энтероцитах [6, 7]. Важными характеристиками этих соединений

являются тип связи между лекарственным средством и соединением липидной природы, оптимальная скорость гидролиза такой связи *in vivo*, необходимая для создания терапевтической концентрации лекарственного средства в месте его действия, а также их токсичность.

*in vivo*, необходимая для создания терапевтической концентрации лекарственного средства в месте его действия, а также их токсичность.

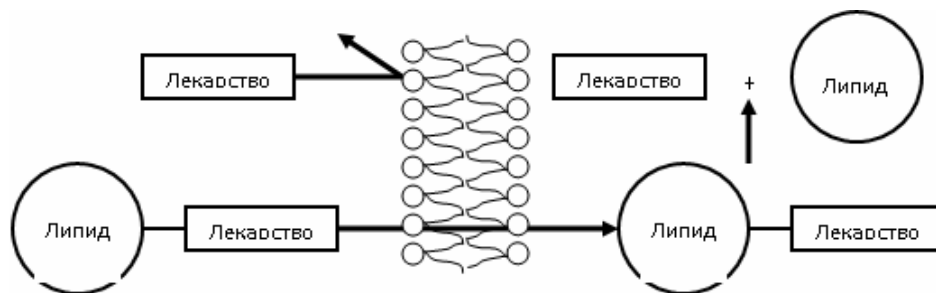
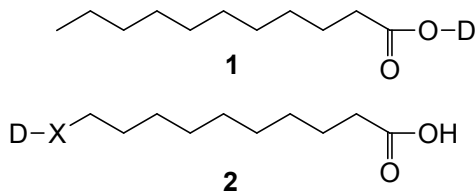


Рис. 1. Принцип использования соединений липидной природы для улучшения мембранотропных свойств гидрофильных фармакологически активных средств.

## КОНСТРУИРОВАНИЕ КОНЬЮГАТОВ АНТИ-ВИЧ-НУКЛЕОЗИДОВ С ВЕЩЕСТВАМИ ЛИПИДНОЙ ПРИРОДЫ

### Пролекарственные соединения на основе жирных кислот

Для создания пролекарственных соединений на основе жирных кислот используется два подхода (рис. 2). При использовании первого подхода фармакологически активное вещество присоединяют к гидрофобной матрице через сложноэфирную связь (соединение 1) [8]. Липофильность препарата в этом случае увеличивается, однако отсутствие свободной карбоксильной группы препятствует связыванию таких соединений с альбумином, осуществляющим транспорт жирных кислот в крови.



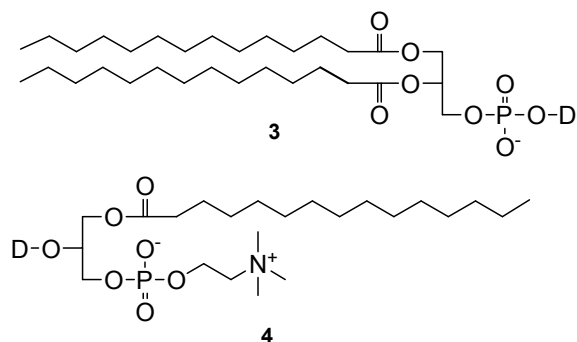
X = O, NH; D (drug) – молекула фармакологически активного соединения

Рис. 2. Жирные кислоты как матрицы для получения липофильных пролекарственных соединений.

Пролекарственные соединения, в которых фармакологически активная молекула находится в  $\omega$ -положении модифицированной жирной кислоты (соединение 2), могут связываться с альбумином сыворотки крови и в виде комплекса попадать в гепатоциты [2]. Таким образом, появляется возможность доставки лекарственных препаратов в клетки печени.

### Пролекарственные соединения на основе фосфолипидов

В большинстве случаев фармакологически активное вещество связывают с фосфатной группой фосфолипида, получая конъюгаты 3 [8, 9], однако в последнее время создаются пролекарственные соединения 4, в которых молекула лекарственного препарата замещает собой жирнокислотную цепь [10] (рис. 3).



D – молекула фармакологически активного соединения

Рис. 3. Подходы к созданию липофильных пролекарственных соединений на основе фосфолипидов.

Данный пролекарственный подход широко применяется для создания конъюгатов фармакологически активных нуклеозидов. Последние подвергаются в организме фосфорилированию до трифосфатов, а использование фосфолипидов в качестве переносчиков позволяет ускорить процесс фосфорилирования за счет того, что первая фосфатная группа уже имеется в молекуле пролекарственного соединения. Осуществлен также синтез липонуклеотидов, в которых аналоги нуклеозидов присоединены к ди- и триацилглицерофосфатам, что увеличивает терапевтическое воздействие лекарства на организм.

### Пролекарственные соединения на основе диглицеридов. Псевдотриглицеридный подход

Панкреатические липазы тонкого кишечника, осуществляющие гидролиз сложноэфирных связей в молекулах триглицеридов, в первую очередь гидролизуют связи в положениях 1 и 3 глицеринового остова, во 2-ом положении этот процесс идет с очень незначительной скоростью [5, 11]. Для того чтобы высвобождение лекарственного средства не происходило в просвете кишечника, при создании липофильных пролекарственных соединений фармакологически активные вещества вводятся во 2-ое положение глицеринового остова (рис. 4) [4, 5, 10–13].

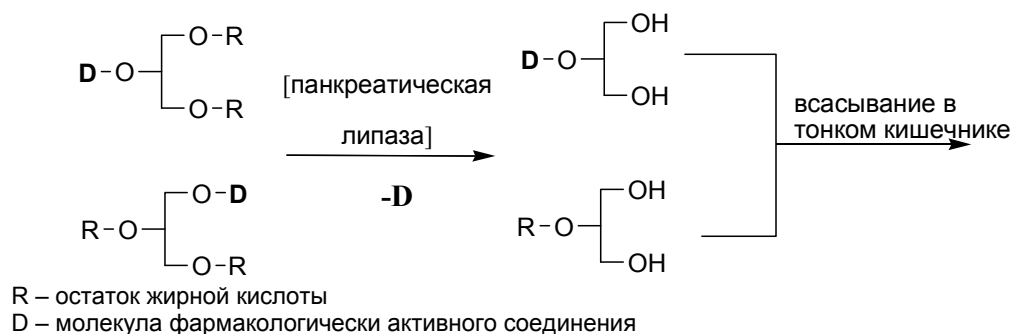


Рис. 4. Стратегии создания псевдотриглицеридных пролекарственных соединений: имитация природных триглицеридов.

Дальнейшие метаболические пути образующихся при ферментативном гидролизе моноглицеридов и жирных кислот зависят от длины жирнокислотных цепей [5]. Желудочно-кишечный тракт богато снабжен лимфатическими и кровеносными сосудами, поэтому абсорбированный материал может попадать либо в кровь (в воротную вену), либо в брыжеечную лимфу (рис. 5). Соединения с короткими цепями ( $< C_{10}$ ) всасываются эпителиальными клетками тощей и подвздошной кишок, попадают в кровь, где связываются с альбумином сыворотки, а затем поступают в печень через воротную вену. Соединения с жирнокислотными цепями средней длины ( $C_{10}-C_{12}$ ) главным образом окисляются, а с длинными цепями ( $> C_{12}$ ) после резорбции эпителиальными клетками – энтероцитами – активируются коферментом А и подвергаются этерификации с образованием новых триглицеридов, которые поступают в лимфу в виде хиломикронов и, в обход печени, через грудной (лимфатический) проток попадают в кровь. Как на апикальной (со стороны просвета

кишечника), так и на противоположной базальной мембранах эпителиальных клеток кишечника находится ряд переносчиков липидов и холестерина, которые вместе с внутриклеточными связывающими белками облегчают абсорбцию и внутриклеточный транспорт таких соединений [5, 14, 15].

Транспорт липидов с жирнокислотными остатками  $> C_{12}$  лимфатической системой, а с остатками  $< C_{10}$  – кровеносной обусловлен несколькими факторами [6, 7]:

- скорость течения жидкости в воротной вене почти в 500 раз выше, чем в лимфатической системе; это способствует тому, что большинство соединений с  $\log P < 5$  (где P – коэффициент распределения между фазами в системе октанол/вода), то есть гидрофильных соединений, всасываются именно в кровь; липиды с остатками длинноцепных жирных кислот, тем более триглицериды, имеют значение  $\log P$  намного больше 5 и попадают из энтероцитов в брыжеечную лимфу;

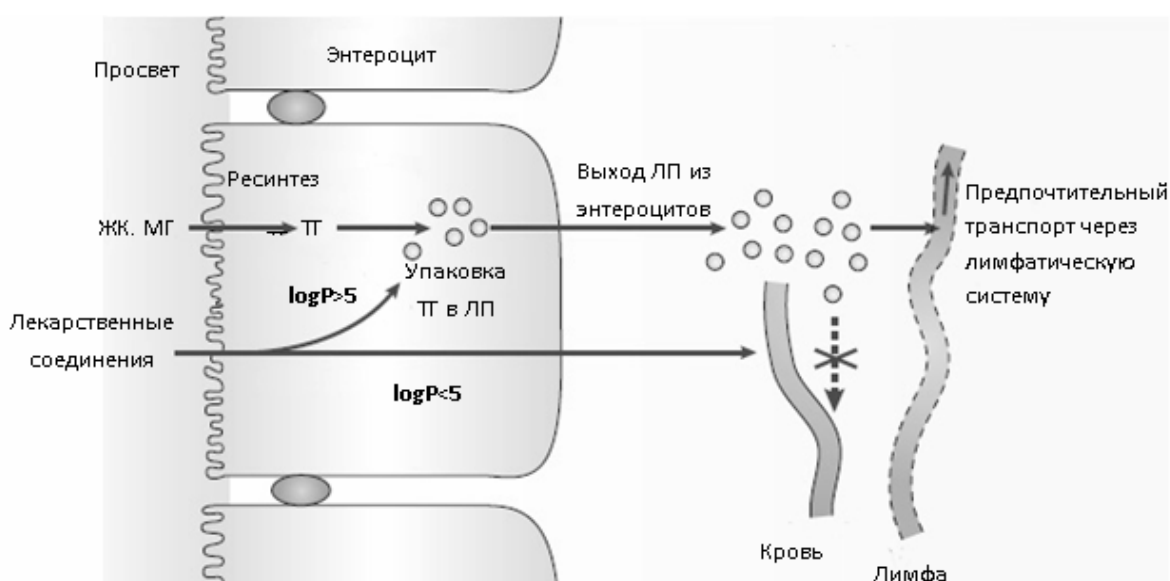


Рис. 5. Схема абсорбции лекарственных соединений в энтероцитах и транспорта в лимфатическую систему и в воротную вену (ЖК – жирные кислоты; МГ – моноглицериды; ТГ – триглицериды; ЛП – липопротеины).

- стенки лимфатических капилляров, в отличие от кровеносных, более перфорированы и проницаемы для соединений с большим молекулярным весом и коллоидных частиц;

- в энтероцитах происходит сборка липопротеинов, главным образом, хиломикронов – шаровидных агрегатов с неполярным ядром из триацилглицеринов и полярной оболочки из фосфолипидов и холестерина. Они обеспечивают транспорт пищевых липидов от кишечника к тканям; достаточно большие размеры липопротеинов обеспечивают их всасывание именно в лимфатическую систему;

- надо также отметить, что наличие в составе липидов остатков моно- и полиненасыщенных жирных кислот способствует сборке более крупных липопротеинов и, следовательно, их лимфатическому транспорту; в лимфу всасываются также и фосфолипиды, особенно фосфатидилхолин.

Таким образом, подход, основанный на увеличении липофильности фармакологически активных соединений посредством их конъюгирования с липидами, содержащими остатки длинноцепных жирных кислот, позволяет нацелить лекарственные средства на лимфатическую систему и, как следствие, на вирусы и опухоли, которые часто локализуются в ней, что особенно актуально для анти-ВИЧ-препаратов, а также на В- и Т-лимфоциты, что важно при использовании иммуномодулирующих средств. Кроме того, данная стратегия позволяет избежать первичного метаболизма лекарственных препаратов в печени и, следовательно, добиться увеличения их биодоступности.

#### **Получение липофильных конъюгатов анти-ВИЧ-нуклеозидов с использованием пронуклеотидного подхода**

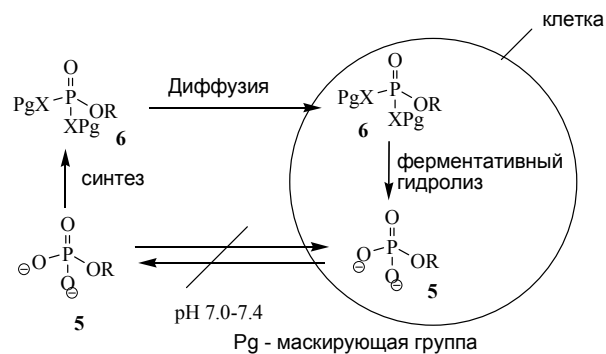
Необходимо отметить, что образование активных фосфатных метаболитов противовирусных нуклеозидных препаратов при действии клеточных нуклеозид(нуклеотид)киназ, лежащее в основе ингибирования вирусспецифических белков в ходе репликативного цикла, зачастую является медленным процессом, снижающим активность данных лекарственных средств. Начальное фосфорилирование является лимитирующей стадией во внутриклеточном метаболизме противовирусных нуклеозидов, поскольку часть из них имеет низкое сродство к нуклеозидкиназам. Кроме того, активность нуклеозидкиназ некоторых клеток, таких как моноциты/макрофаги, может быть недостаточной для удовлетворительного фосфорилирования даже аналогов нуклеозидов, имеющих высокое сродство к ферменту (например, 3'-азидо-3'-дезокситимидина, AZT) [14–17]. Поэтому одним из подходов для решения проблемы инициации фосфорилирования явля-

ется превращение противовирусных нуклеозидов в пролекарственные формы, содержащие в 5'-положении нуклеозида фосфо- или фосфонатэфирные фрагменты, что позволяет в результате внутриклеточного гидролиза получать требуемый нуклеозидмонофосфат.

Внутриклеточная доставка монофосфатной формы приводит к более эффективному образованию трифосфата нуклеозида, чем посредством естественного метаболического пути, и более выгодна для тех препаратов, которые в своей исходной нуклеозидной форме гидролизуются быстрее, чем фосфорилируются клеточными киназами до дидезоксинуклеозидмонофосфата.

Такой пронуклеотидный подход способствует инициации фосфорилирования, позволяет уменьшить промежуток времени от момента введения пролекарственного соединения в организм до момента начала его действия, улучшить характеристики трансмембранного транспорта и изменить внутриклеточный метаболизм нуклеозидных препаратов. Некоторые из таких препаратов, имеющие высокую активность, способны быстро проникать в клетки-мишени и доставлять туда монофосфатную форму противовирусных нуклеозидов, уменьшать их токсическое действие вследствие снижения вводимой дозы [18–21].

Увеличение мембранотропности фосфоэфиров является важной проблемой, с которой сталкиваются при использовании пролекарственных соединений, имеющих в своей структуре фосфатные группы. Фосфат **5** (рис. 6) с низким значением  $pK_a$  (от 1 до 2) при физиологическом значении  $pH$  7.0–7.4 полностью депротонирован и отрицательно заряжен. Поэтому он не может проникать через клеточные мембраны, кроме случаев активного транспорта: эндо- и экзоцитоза или с помощью вирусов. По этой причине необходимо вводить маскирующие защитные группы фосфорного центра, которые будут скрывать отрицательный заряд и способствовать проникновению молекулы **6** через мембраны. Но как только она попадет в клетку, защитные группы должны удалиться либо химическим ( $pH$  7.3), либо ферментативным гидролизом ( $pH$  6.5), с образованием исходного отрицательно заряженного фосфата **5**, который не может выйти во внеклеточное пространство через мембрану и, в отличие от защищенного, имеет фармакологическую активность. Причем гидролиз соединения **6** должен идти как можно с большей скоростью, что позволит увеличить концентрацию лекарства в клетке и, следовательно, уменьшить дозу вводимого в организм лекарственного препарата [22].



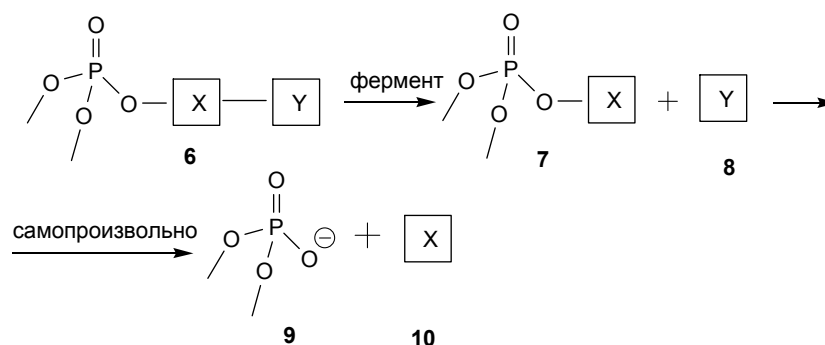
X = O, NH  
R – остаток фармакологически активного соединения

Рис. 6. Принцип использования защитных групп (Pg) на примере фосфомоноэфиров.

Такие защитные группы основаны на создании фосфотриэфира. Этот подход, использующий маскирующие защитные группы, может быть успешно применен для улучшения

мембранопроницаемости как фосфомоноэфиров **5**, так и фосфодиэфиров.

Было показано [22, 23], что для обеспечения ферментативного расщепления соединения **6** с биodeградируемой защитной группой до соединения **5** необходимо, чтобы гидролиз проходил на некотором расстоянии от фосфорного центра фосфотриэфира **6**. Фермент гидролизует лишь концевую часть Y защитной группы, на которую направлена его активность, другая ее часть X отщепляется самопроизвольно. Эта идея получила название концепции «трехкомпонентного пролекарственного соединения» (рис. 7). На основе этого принципа создано достаточно много биodeградируемых защитных групп, в которых сайт действия фермента удален от атома фосфора на некоторое расстояние. Однако при разработке таких защит надо помнить о возможной токсичности продуктов гидролиза.



Y, X – последовательно отщепляемые фрагменты защитной группы

Рис. 7. Концепция «трехкомпонентного пролекарственного соединения».

Наиболее известными и широко используемыми в практике являются следующие маскирующие защитные группы (рис. 8):

- ацилоксиалкильные защиты, к которым относятся ацетоксиметильная (AM) защита ( $R^1 = H, R^2 = Me$ ) и пивалоилоксиметильная (POM) защита ( $R^1 = H, R^2 = tBu$ ) (соединение **11**) [24, 25];

- тиоэтильные производные [10, 11], из которых достаточно распространенными являются S-[(2-гидроксиэтил)сульфидил]-2-тиоэтиловый (DTE) эфир **12** и S-ацил-2-тиоэтиловый (SATE) эфир **13** [26, 27];

- циклическая салициловая (*cycloSal*) защитная группа (соединение **14**), формирующая шестичленное кольцо, которое маскирует отрицательный заряд на фосфате [28–30].

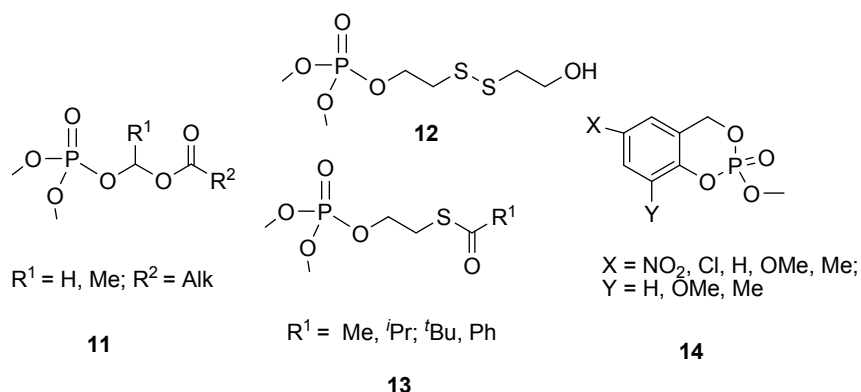
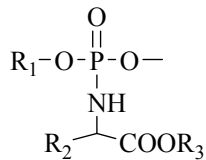


Рис. 8. Примеры маскирующих защитных групп фосфорного центра.

Еще одним подходом к маскировке фосфатных групп и, как следствие, к увеличению мембранотропности фосфоэфиров является синтез на их основе амидофосфатов **15** (рис. 9). Использование в структуре амидофосфатов гидрофобных аминокислот и липидов, содержащих остатки длинноцепных кислот и спиртов, позволяет придать им дополнительную гидрофобность, что, во-первых, актуально для улучшения мембранопроницаемости таких производных, а во-вторых, способствует лимфатическому транспорту пролекарственных соединений [31].

**15**

$\text{R}_1 = \text{Ar}, \text{C}_{16}\text{H}_{33}\text{O}(\text{CH}_2)_3, \text{C}_{18}\text{H}_{37}\text{O}(\text{CH}_2)_3;$

$\text{R}_2 = \text{H}, (\text{L})\text{CH}_3, (\text{L}) \text{ и } (\text{D})(\text{CH}_3)_2\text{CH},$

$(\text{L}) \text{ и } (\text{D})\text{PhCH}_2;$

$\text{R}_3 = \text{CH}_3, \text{CH}_2\text{Ph}, \text{C}(\text{CH}_3)_3$

Рис. 9. Амидофосфаты как мембранотропные производные фосфоэфиров.

### СИНТЕЗ И ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ НОВЫХ ЛИПИДМОДИФИЦИРОВАННЫХ АНТИ-ВИЧ-НУКЛЕОЗИДОВ

На кафедре биотехнологии и бионанотехнологии МИТХТ им. М.В. Ломоносова осуществляется комплекс научных исследований по созданию и изучению свойств новых липонуклеозидных конъюгатов на основе ингибиторов обратной транскриптазы ВИЧ, в течение многих лет проводятся работы по направленному химическому синтезу, выделению и изучению свойств природных и модифицированных биологически активных липидов, компонентов нуклеиновых кислот с целью создания новых противовирусных препаратов с повышенной эффективностью терапевтического действия.

В развитие данных исследований нами на основе псевдотриглицеридного подхода были разработаны стратегии и осуществлен синтез новых пролекарственных соединений анти-ВИЧ-активных нуклеозидов (3'-азидо-3'-дезокситимидина, AZT и 2',3'-дидегидро-3'-дезокситимидина, d4T) **16–21** (рис. 10). Соединение структурных фрагментов полученных глицеролипидных производных проводили с использованием биodeградируемых сложно-эфирных и функциональных фосфорных связей [32].

Модификация спейсерного звена липофильного вектора многоатомными спиртами дает возможность образования между ним и противовирусным нуклеозидом фосфоэфирных

связей, то есть получения пролекарственных соединений **20, 21**. Поскольку фосфорилирование является лимитирующей стадией внутриклеточной модификации нуклеозидов перед тем, как они начнут встраиваться обратной транскриптазой вируса в цепь ДНК [2], такой пронуклеотидный подход позволит уменьшить промежуток времени от момента введения пролекарственного соединения в организм до момента начала его действия.

Кроме того, введение остатков двухатомных спиртов (1,6-гександиола или 1,12-додекандиола) повышает липофильность и, следовательно, позволяет улучшить мембранотропные свойства пролекарственных соединений, нацеливая их на лимфатическую систему организма.

Модификация спейсерной части молекулы введением в ее структуру остатка глицерина приводит к получению пролекарственного соединения **18**, имеющего в своем составе несколько остатков фармакологически активных веществ, что может увеличить бионакопление лекарства в клетках-мишенях. Последнее, в свою очередь, способствует снижению дозы пролекарственного препарата и уменьшению его неблагоприятных побочных эффектов на здоровые клетки.

В процессе транспорта пролекарственных соединений в организме человека к клеткам-мишеням они могут подвергаться как химическому, так и ферментативному гидролизу. Поэтому важной задачей является конструирование пролекарственных соединений с контролируемым высвобождением фармакофоров преимущественно по месту их действия, то есть в клетках-мишенях. При изучении свойств таких конъюгатов необходимо исследовать, в какой степени они подвержены химическому и ферментативному гидролизу.

Для синтезированных на основе нуклеозидных препаратов псевдотриглицеридных пролекарственных соединений, предназначенных для перорального применения, желательно, чтобы скорость их химического гидролиза была достаточно низкой во избежание преждевременного высвобождения лекарственного средства в процессе транспорта в организме к клеткам, инфицированным ВИЧ.

Исследование гидролитических свойств конъюгатов анти-ВИЧ-активных нуклеозидов и производных 1,3-диглицерида **16–19, 21** и проведение предварительных исследований кинетики гидролиза данных липонуклеозидов в буферных растворах, моделирующих pH сред пищеварительного тракта, крови, лимфатической системы, показали, что они стабильны в нейтральных условиях (pH 7.3); в основных условиях (pH 9.5) время половинного гидролиза конъюгатов значительно уменьшается (табл.).

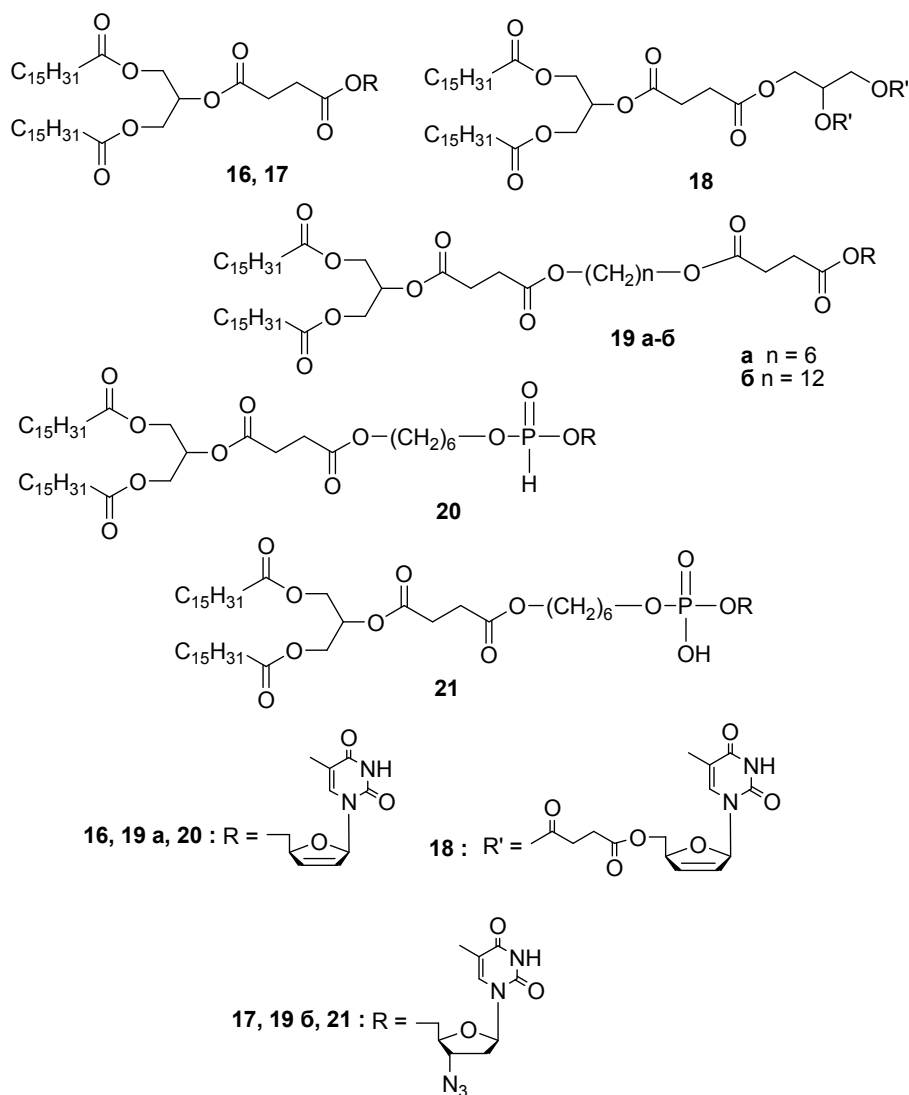


Рис. 10. Глицеролипидные пролекарственные соединения на основе AZT и d4T, полученные с использованием псевдотриглицеридной стратегии.

Так как пролекарственные средства конструируются на основе подхода биоимитации физико-химических и метаболических характеристик природных триглицеридов, то они должны быть чувствительны к действию панкреатической липазы тонкого кишечника человека, подвергаясь гидролизу с образованием 2-псевдомоноглицеридов, которые всасываются клетками эпителия кишечника – энтероцитами [11].

Модель липидного расщепления является широко используемым подходом для оценки липидных систем доставки лекарств *in vitro*. Липолиз пролекарственных средств **16–21** под действием панкреатической липазы свиньи и исследование кинетики гидролиза осуществляли инкубированием липонуклеозидов с ферментом с активностью 375 U/мл при 37°C в PIPES-буфере (pH 6.5) в присутствии тауродезоксихолата натрия в качестве кофактора фермента. Полученные данные по времени половинного гидролиза конъюгатов, а также динамике образования продуктов свидетельствуют о высокой чувствительности исследуемых

пролекарственных соединений к действию панкреатической липазы свиньи (табл.).

Обычно для увеличения лимфатической абсорбции лекарственных соединений предлагаются три вида липидных систем доставки – эмульсии, смешанные мицеллы, липосомы. В большинстве случаев такие лекарственные формы повышают синтез хиломикрон в энтероцитах, и липофильные препараты поступают в кишечную лимфу путем ассоциации с продуктами усвоения жиров, секретирясь совместно с лимфатическими липопротеинами. Установлено, что липонуклеозиды эффективно включаются в фосфолипидный бислой липосом, способных осуществлять транспорт этих лекарственных форм в макрофаги – «хранилища» ВИЧ-инфекции, и таким образом уменьшать токсичность противовирусных нуклеозидов в отношении других клеток. Для разработки таких форм доставки терапевтических агентов на основе синтезированных пролекарственных соединений нами были отработаны подходы к созданию липосомальных препаратов различного

Таблица. Экспериментальные данные химического и ферментативного гидролиза липонуклеозидов.

Соединение	Химический гидролиз t $\frac{1}{2}$ , ч			Ферментативный гидролиз t $\frac{1}{2}$ , мин
	pH 9.5	pH 8.5	pH 7.3	Панкреатическая липаза, pH 6.5
<b>16</b>	2.5	6.0	7.0	23.0
<b>17</b>	14.2	18.0	>26.0*	8.5
<b>18</b>	3.0	6.0	9.5	15.0
<b>19a</b>	2.0	3.5	8.0	6.0
<b>19b</b>	15.0	20.0	>28.0*	17.0
<b>20</b>	-	-	-	1.0
<b>21</b>	7.5	18.0	>22.0*	2.5

\* Значение получено экстраполяцией экспериментальных данных.

состава и определены их свойства. Осуществлено включение липонуклеозидов **17**, **19b** и **21** в липосомы, состоящие из фосфатидилхолина и холестерина, при этом размеры образующихся частиц составили порядка 200–400 нм.

Нами также проводились исследования другого варианта модификации анти-ВИЧ-активных нуклеозидов (AZT и d4T), основанного на использовании в качестве липидной транспортной системы фосфатидилинозита.

Создание лекарственных препаратов на основе природного шестиатомного циклического спирта *мио*-инозита представляется перспективным направлением в конструировании и модификации фармакологически активных соединений. Интерес к химии производных *мио*-инозита обуславливается их высокой биологической активностью. Известно, что *мио*-инозит обладает витаминной активностью и оказывает гиполипидемическое, липотропное, противоопухолевое действие. Кроме того, фосфоинозитиды, являясь минорными компонентами клеточных мембран, принимают активное участие в процессах клеточной регуляции [33]. Поэтому создание на их основе липофильных производных противовирусных нуклеозидов дает возможность улучшить фармакокинетические свойства препаратов, их проницаемость через биологические мембраны, пролонгировать их действие и способствовать направленному транспорту нуклеозидов в клетки-мишени.

Для создания инозитсодержащих липонуклеозидов нами были предложены оригинальные стратегии синтеза сложных фосфолипидов, позволяющие с помощью современных методов функционализации структурных фрагментов

молекул сократить количество синтетических стадий и получить соединения природного и модифицированного строения. На основе разработанных стратегий было проведено сравнительное изучение различных подходов к получению и осуществлен синтез липофильных конъюгатов AZT и d4T **22–24** (рис. 11).

При сравнении двух вариантов получения конъюгатов анти-ВИЧ-активных препаратов и фосфатидилинозита **22**, **23** было обнаружено преимущество стратегии, основанной на первоначальном введении бифункционального спейсера в молекулу частично замещенного *мио*-инозита с последующей этерификацией нуклеозидов, нежели базирующейся на предварительном синтезе нуклеозидного производного, несущего связующий остаток янтарной кислоты [34]. Одновременное введение нескольких остатков сукцинильного эфира AZT дало возможность получить динуклеозидсодержащий фосфоинозитид **24**.

Исследование устойчивости нуклеозид-фосфолипидов **22–24** в условиях pH-зависимого и ферментативного гидролиза с использованием сыворотки крови показало, что данные соединения существенно стабильнее в нейтральных условиях, в основных условиях время половинного гидролиза значительно уменьшается, при этом ферменты не оказывают существенного влияния на деградацию этих соединений. Таким образом, характер выявленного в ходе экспериментов изменения устойчивости соединений в различных условиях позволяет отнести полученные конъюгаты к перспективным модификациям противовирусных нуклеозидных препаратов.



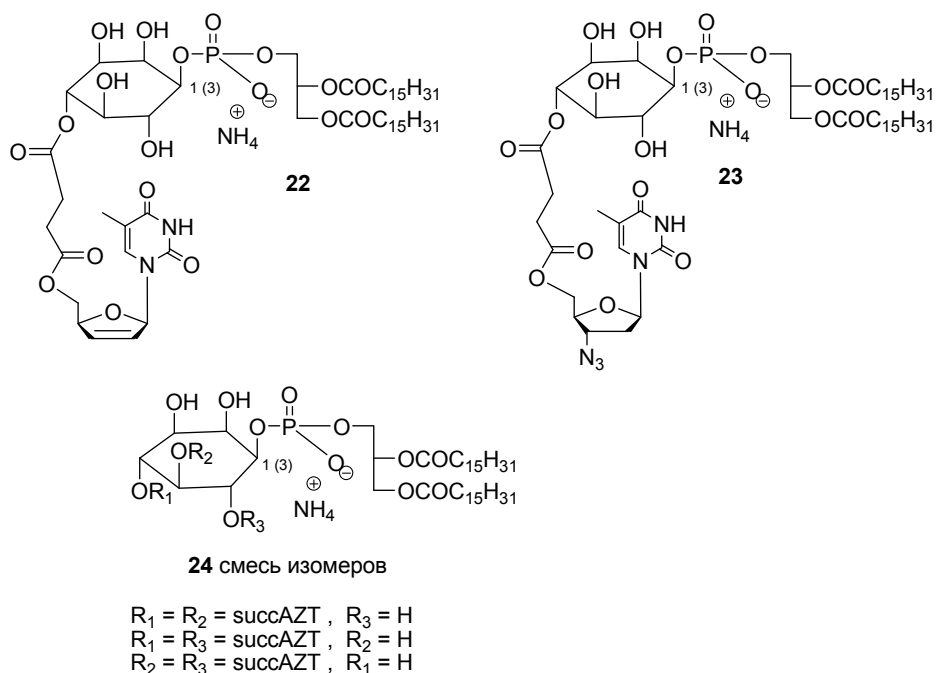


Рис. 11. Конъюгаты AZT и d4T и фосфатидилинозита.

Более полное изучение медико-биологических свойств исследуемых липофильных производных нуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы ВИЧ позволит получить препараты с улучшенными свойствами. Таким образом, разработка липидной стратегии для структурной модификации применяемых в медицинской практике анти-ВИЧ-активных нуклеозидов и получение новых соединений с

высокой биологической активностью представляют возможность потенциального выхода на эффективные противовирусные средства.

*Работа выполнена при финансовой поддержке и в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры России» на 2009–2013 гг. (госконтракт № 14.740.11.0120).*

#### ЛИТЕРАТУРА:

1. Clercq E. Antiviral drugs in current clinical use // J. Clin. Virol. 2004. V. 30. № 2. P. 115–133.
2. Schinazi R.F., Hernandez-Santiago B.I., Hurwitz S.J. Pharmacology of current and promising nucleosides for the treatment of human immunodeficiency viruses // Antivir. Res. 2006. V. 71. P. 322–334.
3. Mehello Y., Clercq E. Twenty-six years of anti-HIV drug discovery: Where do we stand and where do we go? // J. Med. Chem. 2010. V. 53. P. 521–538.
4. Charman W.N., Porter C.J.H. Lipophilic prodrugs designed for intestinal lymphatic transport // Adv. Drug Deliv. Rev. 1996. V. 19. P. 149–169.
5. Lambert D.M. Rationale and applications of lipids as prodrug carrier // Eur. J. Pharm. Sci. 2000. V. 11 (Suppl. 2). P. S15–S27.
6. Trevaskis N.L., Charman W.N., Porter C.J.H. Lipid-based delivery systems and intestinal lymphatic drug transport: A mechanistic update // Adv. Drug Deliv. Rev. 2008. V. 60. P. 702–716.
7. Porter C.J.H., Trevaskis N.L., Charman W.N. Lipids and lipid-based formulations: Optimizing the oral delivery of lipophilic drugs // Nat. Rev. Drug Discov. 2007. V. 6. P. 231–248.
8. Gumina G., Choi Y., Chu C.K. Antiviral nucleosides: Chiral synthesis and chemotherapy. – Amsterdam: Elsevier, 2003. P. 1–76.
9. Holy A. Antiviral acyclic nucleoside phosphonates structure activity studies // Antivir. Res. 2006. V. 71. P. 248–253.
10. Ali S.M., Khan A.R., Ahmad M.U., Sheikh S., Ahmad I. Synthesis and biological evaluation of gemcitabine–lipid conjugate (NEO6002) // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2005. V. 15. P. 2571–2574.
11. Scriba G.K.E. Phenytoin-lipid conjugates as potential prodrugs of phenytoin // Arch. Pharm. (Weinheim). 1993. V. 326. P. 477–481.
12. Lalanne M., Paci A., Andrieux K., Dereuddre-Bosquet N., Clayette P., Deroussent A., Re M., Vassal G., Couvreur P., Desmaële D. Synthesis and biological evaluation of two glycerolipidic prodrugs of didanosine for direct lymphatic delivery against HIV // Bioorg. Med. Chem. 2007. V. 17. P. 2237–2240.
13. Wong A., Toth I. Lipid, sugar and liposaccharide based delivery systems // Curr. Med. Chem. 2001. V. 8. № 9. P. 1123–1136.

14. Clercq E. Toward improved anti-HIV chemotherapy: Therapeutic strategies for intervention with HIV infections // *J. Med. Chem.* 1995. V. 38. № 14. P. 2491–2517.
15. Zemlicka J. Lipophilic phosphoramidates as antiviral pronucleotides // *Biochim. Biophys. Acta.* 2002. V. 1587. P. 276–286.
16. Jones R.J., Bischofberger N. Minireview: Nucleotide prodrugs // *Antiviral Res.* 1995. V. 27. P. 1–17.
17. Saboulard D., Naesens L., Cahard D., Salgado A., Pathirana R., Velazquez S., McGuigan C., Clercq E., Balzarini J. Characterization of the activation pathway of phosphoramidate triester prodrugs of stavudine and zidovudine // *Mol. Pharmacol.* 1999. V. 56. P. 693–704.
18. Hu L. Prodrugs: Effective solutions for solubility, permeability and targeting challenges // *IDrugs.* 2004. V. 7. № 8. P. 736–742.
19. Uckun F.M., Pendergrass S., Venkatachalam T.K., Qazi S., Richman D. Stampidine is a potent inhibitor of zidovudine- and nucleoside analog reverse transcriptase inhibitor-resistant primary clinical human immunodeficiency virus type 1 isolates with thymidine analog mutations // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002. V. 46. № 11. P. 3613–3616.
20. Birkus G., Hitchcock M., Cihlar T. Assessment of mitochondrial toxicity in human cells treated with tenofovir: comparison with nucleoside reverse transcriptase inhibitors // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002. V. 46. № 3. P. 716–723.
21. Clercq E. Antiviral drug discovery and development: Where chemistry meets with biomedicine // *Antivir. Res.* 2005. V. 67. № 2. P. 56–75.
22. Schultz C. Prodrugs of biologically active phosphate esters // *Bioorg. Med. Chem.* 2003. V. 11. P. 885–898.
23. Carl P., Chakravarty P., Katzenellenbogen J. A novel connector linkage applicable in prodrug design // *J. Med. Chem.* 1981. V. 24. № 5. P. 479–480.
24. Schultz C., Vajanaphanich M., Harootunian A.T., Sammak J.P., Barrett E.K., Tsien Y.R. Acetoxymethyl esters of phosphates, enhancement of the permeability and potency of cAMP // *J. Biol. Chem.* 1993. V. 268. P. 6316–6322.
25. Dickson J.K., Biller S.A., Magnin D.R. [et al.]. Orally active squalene synthase inhibitors: bis((acyloxy)alkyl) prodrugs of the  $\alpha$ -phosphonosulfonic acid moiety // *J. Med. Chem.* 1996. V. 39. P. 661–664.
26. Lefebvre I., Perigaud C., Pompon A., Aubertin A.-M., Girardet J.-L., Kirn A., Gosselin G., Imbach J.-L. Mononucleoside phosphotriester derivatives with *S*-acyl-2-thioethyl bioreversible phosphate-protecting groups: Intracellular deliver of 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine 5'-monophosphate // *J. Med. Chem.* 1995. V. 38. P. 3941–3950.
27. Villard A.-L., Coussot G., Lefebvre I., Augustijns P., Aubertin A.M., Gosselin G., Peyrottes S., Perigaud C. Phenyl phosphotriester derivatives of AZT: Variations upon the SATE moiety // *Bioorg. Med. Chem.* 2008. V. 16. P. 7321–7329.
28. Meier C. *cycloSal*-pronucleotides – design of chemical trojan horses // *Mini Rev. Med. Chem.* 2002. V. 2. P. 219–234.
29. Meier C., Clercq E., Balzarini J. Nucleotide delivery from *cycloSal*igenyl-3'-azido-3'-deoxythymidine monophosphates (*cycloSal*-AZTMP) // *Eur. J. Org. Chem.* 1998. V. 1998. P. 837–846.
30. Meier C., Lorey M., Clercq E., Balzarini J. *cycloSal*-2',3'-dideoxy-2',3'-didehydrothymidine monophosphate (*cycloSal*-d4TMP): Synthesis and antiviral evaluation of a new d4TMP delivery system // *J. Med. Chem.* 1998. V. 41. P. 1417–1427.
31. Liang Y., Narayanasamy J., Schinazib R.F., Chu C.K. Phosphoramidate and phosphate prodrugs of (–)- $\beta$ -D-(2*R*,4*R*)-dioxolane-thymine: Synthesis, anti-HIV activity and stability studies // *Bioorg. Med. Chem.* 2006. V. 14. P. 2178–2189.
32. Лоншаков Д.В., Баранова Е.О., Лютик А.И., Шастина Н.С., Швец В.И. Синтез глицеролипидных производных 3'-азидо-3'-дезокситимидина и исследование их свойств // *Хим.-фарм. журн.* 2010. Т. 44. № 10. С. 27–34.
33. Berridge M.J., Lipp P., Bootman M.D. The versatility and universality of calcium signaling // *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2000. V. 1. P. 11–21.
34. Шастина Н.С., Тучная О.А., Эйнисман Л.И., Каширичева И.И., Степанов А.Е., Юркевич А.М., Швец В.И. Исследования в области производных асимметрично замещенного *мио*-инозита. XXXIX. Синтез конъюгата 2',3'-дидегидро-3'-дезокситимидина с фосфатидилинозитом, нового нуклеозидфосфолипида с потенциальной анти-ВИЧ-активностью // *Биоорган. химия.* 2003. Т. 29. № 3. С. 296–302.